CPC 乙酰化酶底物结合区域 Loop 上脯氨酸对其催化特性的影响*

唐存多[1,2§] 史红玲[1§] 马莹[1] 刘飞[1] 许建和[2**] 阚云超[1**] 姚伦广[1**]

（1 南阳师范学院昆虫生物反应器河南省工程实验室 南阳 473061）（2 华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室 上海 200237）

摘 要: 低温 CPC 乙酰化酶在 7-ACA 的生物合成中具有重要作用和显著的优势，开发低温 CPC 乙酰化酶具有重大的经济价值。为了获得在低温下具有更高催化活性的 CPC 乙酰化酶，本文在前期的研究基础上，以先前获得的 CA III^{M} 为亲本，借助分子对接的手段确定了它的底物结合区域，并利用 pyMOL 软件找出了底物结合区域 Loop 上关键的脯氨酸残基，分析后将选定的脯氨酸用甘氨酸进行替换。借助 pET32a 质粒在 *E. coli* BL21(DE3)中进行了可溶性表达研究，除 P272G 外，其它突变体均实现了可溶性表达。P238G、P582G 和 P679G 在 13℃对 CPC 的催化活性分别为 1.25、1.04 和 1.38 U/mg，较亲本的 0.85 U/mg 有了显著的提高。此外，分别考察了亲本及突变体的温度稳定性，它们之间无明显的差异。然后，在 13℃下进行了 7-ACA 低温生物合成的研究，结果表明反应 24 h 后 CPC 的转化率也能达到 80%以上。本研究在 CPC 乙酰化酶冷适应性改造方面取得了较为理想的结果，为进一步的改造及应用奠定了坚实的基础，也为其它低温酶的创制提供了可资借鉴的经验。

关键词: CPC 乙酰化酶 冷适应性 分子改造 理性设计 活性检测

头孢类抗生素抗菌作用强、抗菌谱广且有较好的β-内酰胺酶耐受性，占据了抗生素市场近 50%的份额[1]。而头孢菌素 C（Cephalosporin C, CPC）本身抗菌效能差、毒副作用大，不能直接用作抗菌治疗，只能用于头孢类抗生素母核的合成[2]。目前，头孢类抗生素的母核主要有三大类，包括 7-氨基头孢烷酸（7-aminocephalosporanic acid, 7-ACA）、7-氨基-3-乙酰氧基头孢烷酸（7-amino-3-desacetoxy cephalosporanic acid, 7-ADCA）和 7-苯乙酰胺-3-氯甲基头孢烷酸对甲氧苄酯（7-phenylacetamide-3-chloromethyl-3-cepham-4-carboxylic acid

投稿日期：2017-05-20，修回日期：

*河南省科技攻关项目(162102210116)；河南省高等学校重点科研项目计划(15A416008)；南阳师范学院专项项目（ZX2015016）

** 通讯作者，电子邮箱：jianhexu@ecust.edu.cn；kanyunchao@163.com；lunguangyao@163.com

§ 共同第一作者

p-methyl-oxybenzyl ester, GCLE）。其中 7-ACA 早在 2005 年国内的年总产量已突破 2500 吨，市场价格大约为 650 万/吨[3]，国内一年的产值高达 162.5 亿元，有着巨大的研发前景。

传统的利用化学脱乙酰化制备 7-ACA 的反应条件苛刻且对环境污染较大[4, 5]，新型的生物催化法具有安全性高、环境友好、选择性强及设备投入低等优势[5]。生物催化法常见的主要有两步酶法和一步酶法[4]。两步酶法所使用的关键酶是 D-氨基酸氧化酶和戊二酰-7-氨基头孢烷酸乙酰化酶[6, 7]。与之相比，一步酶法更能简化生产工艺、降低生产成本，在工业生产中更具吸引力[8, 9]。经过国内外学者的不断努力，一步酶法也逐渐实现了产业化。然而，由于 7-ACA 在 20℃以上极不稳定、易产生其它副产物[10]，工业上 7-ACA 的生产一般需要控制在 13℃左右[10]。而现有的 CPC 乙酰化酶最适反应温度较高，在低温下催化活性极低，低温下反应必须得提高加酶量，显著增加了生产成本。迄今为止，国内外均没有成功开发出最适温度低于 20℃的低温 CPC 乙酰化酶的报道。Shin 等人[11]研发出的、占据中国 CPC 乙酰化酶市场垄断地位的突变体的最适温度也仅为 25℃，在 13℃时它的催化活性降低了 2/3 以上。

低温酶，也称嗜冷酶（psychrophilic enzyme）、冷活性酶（cold active enzyme）或适冷酶（cold-adapted enzyme）[12]。目前关于低温酶适冷机理的研究还不够深入，研究者普遍认为低温酶通过特定区域或整个蛋白结构柔顺性的提高，降低了自身的活化能，才能在低温下表现出高催化活性[13, 14]。已有研究报道，减弱蛋白分子内静电的相互作用、减少带电荷的氨基酸残基、在 loop 环区域减少脯氨酸和精氨酸含量而增加甘氨酸含量等均有助于提高蛋白的柔性，进而提高酶的冷适应性[15]。

本文以前期改造获得的 $CAIII^M$ [2]为研究对象，将 $CAIII^M$ 与 CPC 的三维结构进行分子对接，找出底物结合区域 Loop 上的关键脯氨酸残基，然后替换为侧链基团更小的甘氨酸提高底物结合区域 Loop 的柔性，以提高 CPC 乙酰化酶的冷适应性，为低温 CPC 乙酰化酶的创制奠定基础。

1　材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 *Escherichia coli* BL21(DE3)菌株由本研究室保藏；*E. coli* BL21/pET32a-*CA*III^M由本研究室构建和保藏[2]。

1.1.2 试剂与试剂盒 限制性内切酶 *dpn* Ⅰ购自 NEB 公司；PrimeSTAR® HS (Premix)和 DNA Marker 购自 Takara 公司；一站式 His 标记蛋白质微量纯化套装购于北京天恩泽基因科技有限公司，用于重组酶的快速亲和纯化；对二甲氨基苯甲醛（p-Dimethylaminobenzaldehyde, p-DAB）和 7-ACA 标准品购自上海生工生物工程有限公司；CPC-Na 盐和头孢菌素 C 乙酰化酶标样由河南蓝图制药有限公司惠赠；其它试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 方法

1.2.1 底物结合区域 Loop 上关键脯氨酸的选择 首先利用 Modeller 9.9 软件以 CAIII的三维结构（PDB 号：4HSR）为模板模拟出 $CAIII^M$的三维结构，然后利用 AutoDock 4.2 软件将 $CAIII^M$的三维结构与优化后的 CPC 的三维结构进行分子对接，再利用 Pymol 软件对获得的结果进行观察和分析，找出底物结合区域 Loop 上的关键脯氨酸残基，然后分别将这些脯氨酸残基替换为侧链基团较小的甘氨酸残基，提高 CPC 乙酰化酶底物结合区域的柔性，以期增强它在低温下的可变性，进而提高它的冷适应性。

1.2.2 引物的设计、合成及定点突变 基于上述分析的结果分别设计各个正向的突变引物，同时在载体多克隆位点下游约 3 kb 处设计反向的通用引物，将设计的引物委托苏州泓讯生物技术公司合成，然后参照 Sanchis 等人[16]的方法进行全质粒扩增反应完成定点突变，获得各个突变体的编码基因。

1.2.3 头孢菌素 C 乙酰化酶的表达纯化 分别将携带 CPC 乙酰化酶亲本编码基因的 BL21/pET32a-*ca*III^M菌落及各突变菌株接种至 4 mL 的 LB 液体培养基中，200 rpm、37℃培养 14 h，然后以 4%的接种量转接至 100 mL 新鲜的 LB 培养基中，200 rpm、37℃培养 2.5 h，加入终浓度为 0.1 mM 的 IPTG，于 30℃诱导 8 h。离心收集菌体后用 40%占空比

进行超声破碎，将裂解液于 4℃离心获得裂解上清液。裂解上清液经一站式 His 标记蛋白质微量纯化套装纯化后获得电泳纯的重组 CPC 乙酰化酶。

1.2.4 酶活性及蛋白分析　参照本课题组前期建立的 p-DAB 比色法在 13℃下测定 CPC 乙酰化酶的活性[2]。酶活单位定义为在测定条件下每分钟产生 1 μmol 7-ACA 所需的酶量。采用 Bradford 法[17]测定蛋白的浓度，以牛血清白蛋白为参照标准。用 12.5%的分离胶进行 SDS-PAGE 分析[18]，并用 Quantity One 软件计算目的蛋白的表观分子量。

1.2.5 CPC 乙酰化酶温度稳定性分析　分别将亲本及突变体在-80、13 和 25℃下保存 24 h，然后在 13℃测定它们的残留酶活，考察亲本及突变体的温度稳定性。

1.2.6 7-ACA 的低温生物合成　以 5 U/g CPC 的加酶量分别将 50 mL 浓度为 10 g/L 的 CPC 于 13℃下转化 1、2、4、6、8、14、18 和 24 h，用 p-DAB 比色法测定 7-ACA 的产量，进而计算出 CPC 的转化率，初步评价头孢菌素 C 乙酰化酶在低温下的转化效率。本研究中 CPC 的转化率定义为参与转化的 CPC 的质量与总 CPC 的质量之比。

2　结果

2.1 分子对接及突变位点的选择

利用 Modeller 9.9 软件模拟出了 $CAIII^M$ 的三维结构，用 AutoDock 4.2 软件将其与优化后的 CPC 的三维结构进行了分子对接，选取结合自由能最低的复合体构型利用 pymol 软件找出距离底物分子 CPC 6Å范围内的氨基酸残基，将此区域定义为底物结合区域，然后进一步找出底物结合区域 Loop 上的脯氨酸残基，结果如图 1 所示。结果显示，Pro^{238}、Pro^{272}、Pro^{582} 和 Pro^{679} 恰好位于底物结合区域的 Loop 上。已有研究报道底物结合区域的脯氨酸含量能够影响蛋白的柔性[15]，因此本研究为了提高 CPC 乙酰化酶底物结合区域的柔性，提高它在低温下的结构可变性，分别将选定的 4 个脯氨酸突变为侧链基团较小的甘氨酸。

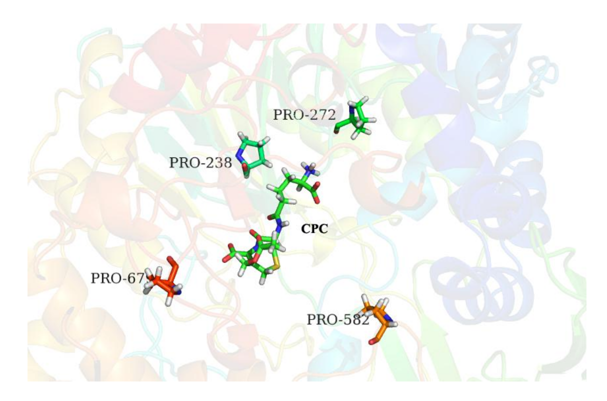


图 1 CPC 与 CAIII^{M} 的三维结构的分子对接模型

Fig. 1 The molecule-docked conformation between 3-D structures of a CPC and CAIII^{M}

2.2 引物的设计及定点突变

基于上述理性分析的结果，借助 Agilent 公司提供的 QuikChange Primer Design Program 设计定点突变的引物，同时在 pET32a 多克隆位点下游 3.2 kb 引物左右的位置设计反向的通用引物 pET28-2254-R，引物的序列如表 1 所示。将 pET28-2254-R 分别与 P238G-F、P272G-F、P582G-F 和 P679G-F 配对进行第一轮 PCR 扩增获得 3 个 DNA 大片段，然后分别进行大引物全质粒扩增，*Dpn* I 酶消化后转化 BL21 感受态细胞，经氨苄抗性筛选和测序鉴定后分别获得 BL21/pET32a-*caIII*^{P238G}、BL21/pET32a-*caIII*^{P272G}、BL21/pET32a-*caIII*^{P582G} 和 BL21/pET32a-*caIII*^{P679G} 突变子。

表 1　CA III^{M} 编码基因定点突变所需的引物

Table 1　Sequences of the primers used for Site-Directed Mutagenesis of CA III^{M}-encoding gene

Name	Remark	Primer sequence (5’-3’)
pET28-2254-R	universal primer	GCCTTACTGGTTAGCAGAATG
P238G-F	Pro^{238}	TCCTGGCGGGTGAC**GGC**CACCG TGTTTTCG
P272G-F	Pro^{272}	GGTGTTCCGGGTTTC**GGC**CACTT CGCGCACAAC
P582G-F	Pro^{582}	TCGCGGCGGTTCCG**GGC**GGTGTT TCTCCGCAG
P679G-F	Pro^{679}	GTTCCGTCTGCGGGT**GGC**GAAG CGACCTACGG

2.3 重组酶的表达及纯化

分别将 BL21/pET32a-*caIII*^{P238G}、BL21/pET32a-*caIII*^{P272G}、BL21/pET32a-*caIII*^{P582G} 和 BL21/pET32a-*caIII*^{P679G} 菌株进行低温、低浓度 IPTG 的诱导表达，BL21/pET32a 作为阴性对照。将 100 mL 发酵液中的菌体离心收集，然后超声破碎，高速离心 30 min 后收集裂解上清，将上清过 0.45 μm 滤膜后用一站式 His 标记蛋白质微量纯化套装进行纯化，并用 3 kDa 截留分子量的超滤离心管进行咪唑的去除和产物的浓缩，最终分别将各重组蛋白定容至 3 mL。将裂解上清液和纯化后的产物分别进行 SDS-PAGE 分析，结果如图 2 和图 3 所示。结果显示，突变子中除了 BL21/pET32a-*caIII*^{P272G} 外均实现了可溶性表达，且自剪切形成了明显的大小亚基，Quantity One 软件估算出大亚基的表观分子量为 60 kDa，小亚基的表观分子量为 40 kDa。同时，结果也表明经过 His 标签亲和层析后，获得了电泳纯的重组酶。利用考马斯亮蓝法测得纯化、浓缩后的 reCAIII^{P238G}、reCAIII^{P582G} 和 reCAIII^{P679G} 的浓度分别为 3.58、4.05 和 4.46 mg/mL。

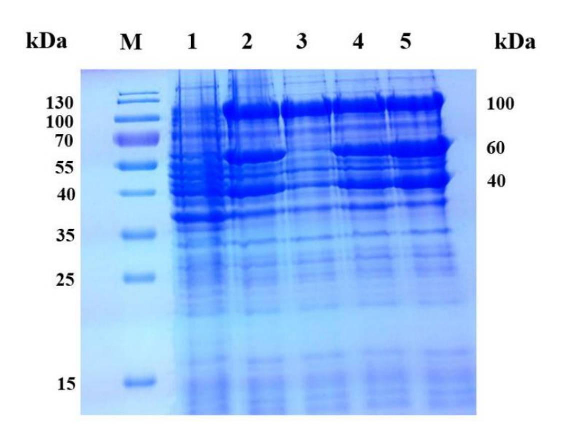


图 2 重组大肠杆菌表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 The SDS-PAGE analysis for the expressed products of recombinant *E. coli*.

M, PageRuler Prestained Protein Ladder; 1, expressed products of BL21/pET32a; 2, expressed products of BL21/pET32a-*caIII*^{P238G}; 3, expressed products of BL21/pET32a-*caIII*^{P272G}; 4, expressed products of BL21/pET32a-*caIII*^{P582G}; 5, expressed products of BL21/pET32a-*caIII*^{P679G}.

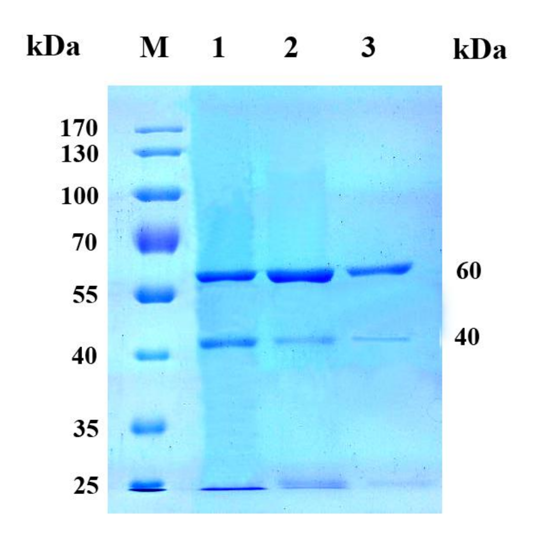


图 3 纯化后的重组 CPC 乙酰化酶的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 The SDS-PAGE analysis for the purified recombinant Cephalosporin C acylases.

M, PageRuler Prestained Protein Ladder; 1, purified reCAIII^{P238G}; 2, purified reCAIII^{P582G}; 3, purified reCAIII^{P679G}.

2.4 重组酶低温下的活性分析

利用 p-DAB 比色法测出纯化、浓缩后的 reCAIII^{P238G}、reCAIII^{P582G}和 reCAIII^{P679G}突变体在 13℃下对 CPC 的比酶活分别为 1.25、1.04 和 1.38 U/mg，较亲本的 0.85 U/mg 有显著的提高。结果表明，底物结合区域 Loop 上脯氨酸的含量对 CPC 乙酰化酶的冷适应性有一定的影响，将脯氨酸突变为甘氨酸能够改善该酶在低温下的适应性。

2.5 重组酶的温度稳定性分析

分别将亲本及突变体在-80、13 和 25℃下孵育 24 h，然后在 13℃测定它们的残留酶活，结果如表 2 所示。结果显示，亲本及突变体的温度稳定性较好，尽管突变体的稳定性较亲本稍有下降，但它们在贮存温度（-80℃）和工作温度（13 和 25℃）下孵育 24 h 后残留酶活仍能超过 85%，不影响它们的使用范围。

表 2　亲本及突变体的温度稳定性

Table 2　Temperature stability of the parent and mutants

Name	Residul activity after incubation for 24 hours (%)		
	-80℃	13℃	25℃
Parent	99	98	92
reCAIII^{P238G}	97	95	90
reCAIII^{P582G}	98	90	86
reCAIII^{P679G}	98	92	85

2.6 7-ACA 的低温生物合成

按照 1.2.6 中的方法初步研究了突变酶在低温下催化 CPC 合成 7-ACA 的工艺，CPC 的转化率随时间的变化情况如图 4 所示。随着反应时间的延长，CPC 的转化率会逐渐增加，当反应进行到 24 h 时 CPC 的转化率接近 80%，且趋于稳定。此外，在同样加酶量的情况下，突变体的转化率较亲本的也略有提高。

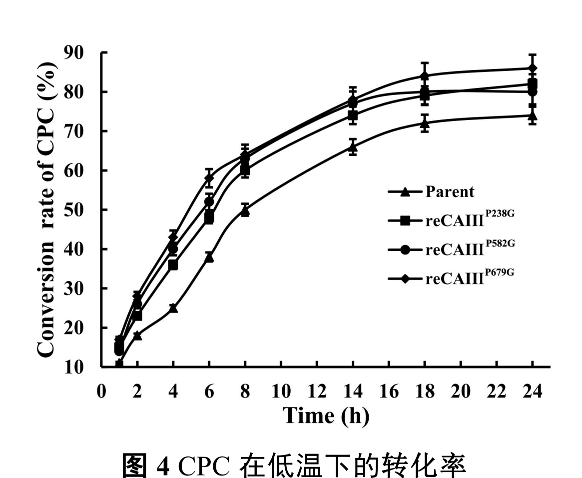


图 4 CPC 在低温下的转化率

Fig. 4　The conversion rate of CPC at low temperature

3　讨论

7-ACA 是头孢类抗生素重要的合成砌块，开发低成本、高质量合成 7-ACA 的工艺具有重要的研究价值和科学意义。在 7-ACA 的所有制备方法中，一步酶法最具优势和潜力[19]。另外，由于 7-ACA 在 20℃以上极不稳定、合成过程中易产生其它副产物[10]，不利于后续的纯化精制，因此它的合成需要在低温下进行，工业上 7-ACA 的生产一般需要控制在 13℃左右。遗憾的是，现有的 CPC 乙酰化酶的冷适应性较差，在 13℃下的活性太低，大大增加了 7-ACA 的合成成本。本文试图通过改变底物结合区域的柔性，提高酶在低温下的可变形能力，以期提高它的冷适应性。

以先前获得的 CPC 乙酰化酶突变体 $CAIII^{M}$ 为亲本[2]，借助分子对接的技术确定了它的底物结合区域，并在底物结合区域的 Loop 上选定了 4 个脯氨酸残基 Pro^{238}、Pro^{272}、Pro^{582} 和 Pro^{679}，鉴于以前对 Linker 的研究及文献分析[15]，分别将它们突变为侧链基团较小的甘氨酸。可溶性表达的结果显示当 272 位的脯氨酸变为甘氨酸后，表达产物未能进行自剪切，无法形成正确的大小亚基，其它三个突变体均能实现可溶性表达。据 Li[20]等人报道 CPC 乙酰化酶的自剪切有其固有的识别机制，272 位的突变可能影响了它的自剪切，故未能正确折叠和剪切。

酶活测定结果显示，$reCAIII^{P238G}$、$reCAIII^{P582G}$ 和 $reCAIII^{P679G}$ 突变体在 13℃下对 CPC

的比酶活较亲本有明显的提高，这也说明底物结合区域 Loop 结构柔性的改变能够影响它在低温下的可变形能力，进而影响它的催化活性。柔性的提高在一定程度上也会影响酶的温度稳定性，温度稳定性的研究结果也表明突变体的温度稳定性较亲本有一定下降，但是下降的幅度不是很大，残留酶活都能维持在 85%以上。在后续的研究中，我们可以考虑将各突变位点进行组合突变，同时适当提高底物结合区域以外结构域的刚性，以实现进一步提高 CPC 乙酰化酶在低温下的催化能力，同时能够尽量保持它的稳定性。本研究在 CPC 乙酰化酶冷适应性改造方面取得了较为理想的结果，为进一步的改造及应用奠定了坚实的基础，也为其它低温酶的创制提供了可资借鉴的经验。

参考文献：

[1] Tramper J, Beeftink HH, Janssen AEM *et al*. Biocatalytic production of semi-synthetic cephalosporins: process technology and integration. In: *Synthesis of β-Lactam Antibiotics*. Edited by Bruggink A: Springer Netherlands, 2001. 206-249.

[2] 马晨露，唐存多，史红玲等. 头孢菌素 C 乙酰化酶的半理性改造及 7-ACA 的生物合成 [J]. 中国生物工程杂志, 2015(12):65-71.

Ma CL, Tang CD, Shi HL *et al*. Semi rational modification of cephalosporin C acylase and biosynthesis of 7-ACA. China Biotechnology, 2015(12):65-71.

[3] 薛亮. 头孢类抗生素及中间体发展浅析 [J]. 精细化工原料及中间体, 2007(03):27-29

Xue L. Development analysis of cephalosporins and its intermediate. Fine Chemical Industrial Raw Materials and Intermediates, 2007(03):27-29.

[4] Sonawane VC. Enzymatic Modifications of Cephalosporins by Cephalosporin Acylase and Other Enzymes [J]. Crit Rev Biotechnol, 2006, 26(2):95-120.

[5] Pollegioni L, Rosini E, Molla G. Cephalosporin C acylase: dream and(/or) reality [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2013, 97(6):2341-2355.

[6] Pollegioni L, Molla G, Sacchi S *et al*. Properties and applications of microbial D-amino acid oxidases: current state and perspectives [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2008, 78(1):1-16.

[7] 姚舜，罗晖，常雁红等. 一步酶法生产 7－氨基头孢烷酸的研究进展 [J]. 现代化工, 2013, 33(2):11-14.

Yao S, Luo H, Chang YH *et al.* Research progress in one-step enzymatic conversion of cephalosporin C to 7-aminocephalosporanic acid. Modern Chemical Industry, 2013, 33(2): 11-14.

[8] Wang Y, Yu H, Song W *et al*. Overexpression of synthesized cephalosporin C acylase containing mutations in the substrate transport tunnel [J]. J Biosci Bioeng, 2012, 113(1):36-41.

[9] Zhu X, Luo H, Chang Y *et al*. Characteristic of immobilized cephalosporin C acylase and its application in one-step enzymatic conversion of cephalosporin C to 7-aminocephalosporanic acid [J]. World J Microb Biotechnol, 2011, 27(4):823-829.

[10] 柳杏辉. 酶法制备新型医药中间体 D-7-ACA 工艺研究 [D]: 西安: 西北大学, 2009.

Liu XH. Study on producing a new pharmaceutieal intermediate D-7-ACA with enzymatic technology [D]. Xi an: Northwest University, 2009.

[11] YC S, JY J, KH J: **Cephalosporin C acylase mutant and method for preparing 7-ACA using same**. In., vol. 7592168. US; 2007.

[12] 曾胤新, 蔡明宏, 俞勇等. 微生物低温酶适冷机制研究进展 [J]. 中国生物工程杂志, 2003(10):52-56.

Zeng YX, Cai MH, Yu Y *et al*. Progress of molecular adaptation of cold enzymes from microorganisms. China Biotechnology, 2003(10):52-56.

[13] Ramya LN, Pulicherla KK. Molecular insights into cold active polygalacturonase enzyme for its potential application in food processing [J]. J Food Sci Technol, 2015, 52(9):5484-5496.

[14] Feller G, Gerday C. Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation [J]. Nat Rev Microbiol, 2003, 1(3):200-208.

[15] Tang MA, Motoshima H, Watanabe K. Cold adaptation: structural and functional characterizations of psychrophilic and mesophilic acetate kinase [J]. Protein J, 2014, 33(4):313-322.

[16] Sanchis J, Fernández L, Carballeira JD *et al*. Improved PCR method for the creation of saturation mutagenesis libraries in directed evolution: application to difficult-to-amplify templates [J]. Appl Microb Biotechnol, 2008, 81(2):387-397.

[17] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Anal Biochem, 1976, 72:248-254.

[18] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 227:680–685.

[19] 徐雪丽, 张伟, 刘艳等. 头孢菌素 C 酰化酶突变位点的研究 [J]. 中国生物工程杂志, 2015(02):59-65.

Xu XL, Zhang W, Liu Y *et al.* Study on mutaions of cephalosporin C acylase. China Biotechnology, 2015(02): 59-65.

[20] Li Y, Chen J, Jiang W *et al*. In vivo post-translational processing and subunit reconstitution of cephalosporin acylase from Pseudomonas sp. 130 [J]. European Journal of Biochemistry, 1999, 262(3):713-719.

Effect of prolines in the loop of CPC acylase substrate binding region on its catalytic properties

TANG Cun-duo[1,2§] SHI Hong-ling[1§] MA Ying[1] LIU Fei[1] XU Jian-he[2]**

KAN Yun-chao[1] YAO Lun-guang[1**]**

(1 Henan Provincial Engineering Laboratory of Insect Bio-reactor, Nanyang Normal University, Nanyang 473061, China) (2 State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: Cold-active CPC acylase plays an important role and has significant advantage in the biosynthesis of 7-ACA, thus developing cold-active CPC acylase has significant economic value. In order to obtain the CPC acylase with higher catalytic activity at low temperature, on the basis of previous research, the previously obtained CA III^M was taken as a parent, confirmed its substrate binding region by the method of molecular docking, and found the key proline residues in the loop of CPC acylase substrate binding region by pyMOL. After analyzing, the selected prolines were mutated into glycines, respectively. The study of soluble expression was carried out in *E. coli* BL21(DE3) with pET32a plasmid, and soluble expression was achieved in the other mutants except P272G. Catalytic activity of P238G, P582G and P679G to CPC was 1.25, 1.04 and 1.38 U/mg respectively at 13 °C, and there was a significant improvement compared with parental 0.85 U/mg. Moreover, the stability of parent and mutants was investigated, and there was no obvious difference between them. Afterwards, the low temperature biosynthesis of 7-ACA was carried out at 13 °C, and the results showed that the conversion rate of CPC can reach 80% and above after 24 h . This research gained ideal results in cold adaptation improvement of CPC acylase, established a solid foundation for further transformation and application, and provided a useful experience for the creating of other low-temperature enzymes.

Keywords: CPC acylase cold adaptation molecular modification rational design activity assay